

DIN EN ISO 20227



ICS 13.060.70

Einsprüche bis 2016-07-13

Entwurf

**Wasserbeschaffenheit —
Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von Abwässern,
natürlichen Wässern und Chemikalien auf die Wasserlinsenart *Spirodela
polyrhiza* —
Verfahren mittels Stammkultur unabhängigem mikrobiologischem Test
(ISO/DIS 20227:2016);
Deutsche und Englische Fassung prEN ISO 20227:2016**

Water quality —

Determination of the growth inhibition effects of waste waters, natural waters and chemicals on the duckweed *Spirodela polyrhiza* —

Method using a stock culture independent microbiotest (ISO/DIS 20227:2016);

German and English version prEN ISO 20227:2016

Qualité de l'eau —

Détermination des effets d'inhibition de la croissance des eaux usées, des eaux naturelles et des produits chimiques sur la lentille d'eau *Spirodela polyrhiza* —

Méthode utilisant un microbiotest indépendant de la culture mre (ISO/DIS 20227:2016);

Version allemande et anglaise prEN ISO 20227:2016

Anwendungswarnvermerk

Dieser Norm-Entwurf mit Erscheinungsdatum 2016-05-13 wird der Öffentlichkeit zur Prüfung und Stellungnahme vorgelegt.

Weil die beabsichtigte Norm von der vorliegenden Fassung abweichen kann, ist die Anwendung dieses Entwurfes besonders zu vereinbaren.

Stellungnahmen werden erbeten

- vorzugsweise online im Norm-Entwurfs-Portal des DIN unter www.entwuerfe.din.de bzw. für Norm-Entwürfe der DKE auch im Norm-Entwurfs-Portal der DKE unter www.entwuerfe.normenbibliothek.de, sofern dort wiedergegeben;
- oder als Datei per E-Mail an naw@din.de möglichst in Form einer Tabelle. Die Vorlage dieser Tabelle kann im Internet unter www.din.de/stellungnahme oder für Stellungnahmen zu Norm-Entwürfen der DKE unter www.dke.de/stellungnahme abgerufen werden;
- oder in Papierform an den DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW), 10772 Berlin (Hausanschrift: Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin).

Die Empfänger dieses Norm-Entwurfs werden gebeten, mit ihren Kommentaren jegliche relevanten Patentrechte, die sie kennen, mitzuteilen und unterstützende Dokumentationen zur Verfügung zu stellen.

Gesamtumfang 59 Seiten

DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW)

Nationales Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20227:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN (Deutschland) gehalten wird.

Das zuständige deutsche Gremium ist der Arbeitskreis NA 119-01-03-05-01 AK „Biotests“ des Arbeitsausschusses NA 119-01-03 AA „Wasseruntersuchung“ im DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW).

Um Zweifelsfälle in der Übersetzung auszuschließen, ist die englische Originalfassung der prEN ISO 20227 beigelegt. Die Nutzungsbedingungen für den deutschen Text des Norm-Entwurfes gelten gleichermaßen auch für den englischen Text.

Bezeichnung des Verfahrens:

Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von Abwässern, natürlichen Wässern und Chemikalien auf die Wasserlinsenart *Spirodela polyrhiza* — Verfahren mittels Stammkultur unabhängigem mikrobiologischem Test

Verfahren DIN EN ISO 20227

Für die in diesem Dokument zitierten Internationalen Normen wird im Folgenden auf die entsprechenden Deutschen Normen hingewiesen:

ISO 5667-16	siehe E DIN EN ISO 5667-16
ISO 5725-1	siehe DIN ISO 5725-1
ISO 5725-2	siehe DIN ISO 5725-2
ISO 20079	siehe DIN EN ISO 20079

Es ist erforderlich, bei den Untersuchungen nach dieser Norm Fachleute oder Facheinrichtungen einzuschalten und bestehende Sicherheitsvorschriften zu beachten.

Bei Anwendung der Norm ist im Einzelfall je nach Aufgabenstellung zu prüfen, ob und inwieweit die Festlegung von zusätzlichen Randbedingungen erforderlich ist.

Die vorliegende Norm enthält das vom DIN-Normenausschuss Wasserwesen (NAW) und von der Wasserchemischen Gesellschaft – eine Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker – gemeinsam erarbeitete Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung:

Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von Abwässern, natürlichen Wässern und Chemikalien auf die Wasserlinsenart *Spirodela polyrhiza* — Verfahren mittels Stammkultur unabhängigem mikrobiologischem Test.

Die als DIN-Normen veröffentlichten Deutschen Einheitsverfahren sind bei der Beuth Verlag GmbH einzeln oder zusammengefasst erhältlich. Außerdem werden die genormten Deutschen Einheitsverfahren in der Loseblattsammlung „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ gemeinsam von der Beuth Verlag GmbH und der Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA publiziert.

Normen oder Norm-Entwürfe mit dem Gruppentitel „Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung“ sind in folgende Gebiete (Haupttitel) aufgeteilt:

Allgemeine Angaben (Gruppe A)

Sensorische Verfahren (Gruppe B)

Physikalische und physikalisch-chemische Kenngrößen (Gruppe C)

Anionen (Gruppe D)

Kationen (Gruppe E)

Gemeinsam erfassbare Stoffgruppen (Gruppe F)

Gasförmige Bestandteile (Gruppe G)

Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H)

Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K)

Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L)

Biologisch-ökologische Gewässeruntersuchung (Gruppe M)

Einzelkomponenten (Gruppe P)

Schlamm und Sedimente (Gruppe S)

Suborganismische Testverfahren (Gruppe T)

Über die bisher erschienenen Teile dieser Normen gibt die Geschäftsstelle des Normenausschusses Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Telefon 030 2601-2448, oder die Beuth Verlag GmbH, 10772 Berlin (Hausanschrift: Am DIN-Platz, Burggrafenstr. 6, 10787 Berlin), Auskunft.

Nationaler Anhang NA
(informativ)

Literaturhinweise

E DIN EN ISO 5667-16, *Wasserbeschaffenheit — Probenahme — Teil 16: Anleitung zur Probenahme und Durchführung biologischer Testverfahren*

DIN EN ISO 20079, *Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der toxischen Wirkung von Wasserinhaltsstoffen und Abwasser gegenüber Wasserlinsen (Lemna minor) — Wasserlinsen-Wachstumshemmtest*

DIN ISO 5727-1, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Meßverfahren und Meßergebnissen — Teil 1: Allgemeine Grundlagen und Begriffe*

DIN ISO 5725-2, *Genauigkeit (Richtigkeit und Präzision) von Messverfahren und Messergebnissen — Teil 2: Grundlegende Methode für Ermittlung der Wiederhol- und Vergleichpräzision eines vereinheitlichten Messverfahrens*

Wasserbeschaffenheit — Bestimmung der wachstumshemmenden Wirkung von Abwässern, natürlichen Wässern und Chemikalien auf die Wasserlinsenart *Spirodela polyrhiza* — Verfahren mittels Stammkultur unabhängigem mikrobiologischem Test (ISO/DIS 20227:2016)

Qualité de l'eau — Détermination des effets d'inhibition de la croissance des eaux usées, des eaux naturelles et des produits chimiques sur la lentille d'eau Spirodela polyrhiza — Méthode utilisant un microbiotest indépendant de la culture mère (ISO/DIS 20227:2016)

Water quality — Determination of the growth inhibition effects of waste waters, natural waters and chemicals on the duckweed Spirodela polyrhiza — Method using a stock culture independent microbiotest (ISO/DIS 20227:2016)

ICS:

Deskriptoren:

Dokument-Typ: Europäische Norm
Dokument-Untertyp:
Dokumentstufe: parallele Umfrage
Dokumentsprache: D

STD Version 2.8f

Inhalt

	Seite
Europäisches Vorwort	3
Vorwort	4
Einleitung	5
1 Anwendungsbereich	7
2 Normative Verweisungen	7
3 Begriffe	7
4 Grundsatz	8
5 Testorganismen	9
6 Wachstumsmedium	9
7 Geräte	10
8 Referenzchemikalien	11
9 Verfahrensweise	11
10 Datenbearbeitung – Berechnung der Wachstumshemmung	18
11 Gültigkeitskriterien	18
12 Testempfindlichkeit	19
13 Test mit Referenzchemikalien	19
14 Testbericht	21
Anhang A (informativ) Stammkultivierung von <i>Spirodela polyrhiza</i> für die Turionenherstellung	22
Anhang B (informativ) Empfindlichkeit des Mikrobiotests mit <i>Spirodela polyrhiza</i>	23
Anhang C (informativ) Durchführungsdaten	26
Literaturhinweise	27

Europäisches Vorwort

Dieses Dokument (prEN ISO 20227:2016) wurde vom Technischen Komitee ISO/TC 147 „Water quality“ in Zusammenarbeit mit dem Technischen Komitee CEN/TC 230 „Wasseranalytik“ erarbeitet, dessen Sekretariat vom DIN gehalten wird.

Dieses Dokument ist derzeit zur parallelen Umfrage vorgelegt.

Anerkennungsnotiz

Der Text von ISO/DIS 20227:2016 wurde vom CEN als prEN ISO 20227:2016 ohne irgendeine Abänderung genehmigt.

Vorwort

ISO (die Internationale Organisation für Normung) ist eine weltweite Vereinigung von Nationalen Normungsorganisationen (ISO-Mitgliedsorganisationen). Die Erstellung von Internationalen Normen wird normalerweise von ISO Technischen Komitees durchgeführt. Jede Mitgliedsorganisation, die Interesse an einem Thema hat, für welches ein Technisches Komitee gegründet wurde, hat das Recht, in diesem Komitee vertreten zu sein. Internationale Organisationen, staatlich und nicht-staatlich, in Liaison mit ISO, nehmen ebenfalls an der Arbeit teil. ISO arbeitet eng mit der Internationalen Elektrotechnischen Kommission (IEC) bei allen elektrotechnischen Themen zusammen.

Die Verfahren, die bei der Entwicklung dieses Dokuments angewendet wurden und die für die weitere Pflege vorgesehen sind, werden in den ISO/IEC-Direktiven, Teil 1 beschrieben. Im Besonderen sollten die für die verschiedenen ISO-Dokumentenarten notwendigen Annahmekriterien beachtet werden. Dieses Dokument wurde in Übereinstimmung mit den Gestaltungsregeln der ISO/IEC-Direktiven, Teil 2 erarbeitet (siehe www.iso.org/directives).

Es wird auf die Möglichkeit hingewiesen, dass einige Elemente dieses Dokuments Patentrechte berühren können. ISO ist nicht dafür verantwortlich, einige oder alle diesbezüglichen Patentrechte zu identifizieren. Details zu allen während der Entwicklung des Dokuments identifizierten Patentrechten finden sich in der Einleitung und/oder in der ISO-Liste der empfangenen Patenterklärungen (siehe www.iso.org/patents).

Jeder in diesem Dokument verwendete Handelsname wird als Information zum Nutzen der Anwender angegeben und stellt keine Anerkennung dar.

Eine Erläuterung der Bedeutung ISO-spezifischer Benennungen und Ausdrücke, die sich auf Konformitätsbewertung beziehen, sowie Informationen über die Beachtung der Grundsätze der Welthandelsorganisation (WTO) zu technischen Handelshemmnissen (TBT, en: Technical Barriers to Trade) durch ISO enthält der folgende Link: www.iso.org/iso/foreword.html.

Das für dieses Dokument verantwortliche Komitee ist ISO/147, *Water quality*, Subcommittee SC 5, *Biological methods*.

Einleitung

Wasserlinsen sind freischwebende höhere Wasserpflanzen, die häufig in der ökotoxikologischen Forschung zur Beurteilung der Toxizität von Abwasser, natürlichen Gewässern und Chemikalien verwendet werden (siehe ISO 20079 und Literaturhinweise [1] bis [6] sowie Literaturhinweis [7] speziell für Pflanzenschutzmittel).

Bei Wasserlinsen handelt es sich um schnell wachsende Pflanzen, von denen viele weltweit verbreitet sind. Dadurch sind sie gut als Primärproduzenten zur Gefährdungsbeurteilung von Schadstoffen in Süßwasserumgebungen geeignet.

Im Gegensatz zu Erdpflanzen, bei denen die Biotests bereits während des „ruhenden“ Lebensstadiums (Keimlinge) begonnen werden können, sind für Toxizitätsprüfungen mit Wasserlinsen eine ständige Kultivierung und Pflege des Lebendstämme nötig, einschließlich der damit verbundenen biologischen, technischen und finanziellen Aufwendungen.

Einige Wasserlinsenarten jedoch produzieren „ruhende vegetative Knospen“ (Turionen), die für lange Zeit gelagert werden können und welche zum Zeitpunkt der Durchführung des Biotests „auf Abruf“ keimen können.

Bei einer der turionenproduzierenden Wasserlinsen handelt es sich um *Spirodela polyrhiza*. Diese Art wurde letztlich für einen einfachen und praktischen Mikrobiotest ausgewählt, welcher unabhängig von der Stammkultivierung und Pflege des Lebendstammes ist.

Es wurde festgestellt, dass *Spirodela polyrhiza* genauso empfindlich auf Giftstoffe reagiert wie die konventionellen Biotests mit Wasserlinsen.

Das Mikrobiotestverfahren für diese Internationale Norm beinhaltet eine 3-tägige Keimung der Turionen mit anschließendem 3-tägigen Toxizitätstest auf einer Mikrotiterplatte, wobei die Bestimmung der Wachstumshemmung der ersten Fronds per Bildanalyse erfolgt.

Der Mikrobiotest mit *Spirodela polyrhiza* ist sehr einfach und leicht durchzuführen und verfügt über eine Reihe von Vorteilen gegenüber dem konventionellen Wasserlinsentest:

- 1) für den Biotest ist keine Kultivierung oder Pflege von Lebendstämmen der Testarten nötig und er kann durch Verwendung von gelagerten Turionen „zu jeder Zeit und überall“ durchgeführt werden;
- 2) gelagerte Turionen erzielen selbst nach mehreren Monaten in Lagerung einen großen Keimungserfolg;
- 3) für den Mikrobiotest werden wenig Arbeitsfläche und Inkubationsplatz sowie wenig Ausrüstung benötigt;
- 4) für den Test ist keine Manipulation der Organismen während oder am Ende des Tests notwendig;
- 5) die Flächenmessungen der ersten Fronds müssen nicht sofort erfolgen und können auf eine geeignete Zeit verschoben werden;
- 6) die Flächenmessungen durch Bildanalyse erfolgen sehr schnell und genau und dauern für einen kompletten Test weniger als eine Stunde.

ACHTUNG — Personen, die dieses Dokument verwenden, sollten mit der normalen Laborpraxis vertraut sein. Dieses Dokument erhebt nicht den Anspruch, alle Sicherheitsprobleme anzusprechen, die eventuell bei ihrer Anwendung auftreten können. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, geeignete Sicherheits- und Gesundheitspraktiken zu schaffen und die Einhaltung nationaler regulatorischer Auflagen sicherzustellen.

WICHTIG — Es ist äußerst wichtig, dass die in Übereinstimmung mit diesem Dokument durchgeführten Prüfungen durch entsprechend geschultes Personal ausgeführt werden.

1 Anwendungsbereich

Diese Internationale Norm legt ein Verfahren zur Bestimmung der Wachstumshemmung der ersten Fronds von aus Turionen gekeimten *Spirodela polyrhiza* durch Substanzen und Substanzmischungen in Wasser oder Abwasser einschließlich behandeltem kommunalen Abwasser und industriellem Abwasser fest.

Der Test ist auch für reine Chemikalien und insbesondere für Pflanzenschutzmittel und Pestizide geeignet.

2 Normative Verweisungen

Die folgenden zitierten Dokumente, die in diesem Dokument teilweise oder als Ganzes zitiert werden, sind für die Anwendung dieses Dokuments erforderlich. Bei datierten Verweisungen gilt nur die in Bezug genommene Ausgabe. Bei undatierten Verweisungen gilt die letzte Ausgabe des in Bezug genommenen Dokuments (einschließlich aller Änderungen).

ISO 5667-16, *Water quality — Sampling — Part 16: Guidance on biotesting of samples*

ISO 20079, *Water quality — Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on duckweed (Lemna minor) — Duckweed growth inhibition test*

ISO/TS 20281, *Water quality — Guidance on statistical interpretation of ecotoxicity data*

3 Begriffe

Für die Anwendung dieses Dokuments gelten die folgenden Begriffe.

3.1

EC_x

berechnete Konzentration (einer Substanz) oder Verdünnung (einer wässrigen Untersuchungsprobe in %) für die eine Wirkung von x % im Vergleich zur Kontrolle erwartet wird

3.2

Frond

blattanaloge Struktur, welche sich aus einem gekeimten Turion entwickelt

3.3

Wachstum

Zunahme der Größe des ersten aus einem gekeimten Turion entwickelten Fronds

3.4

Wachstumsmedium

Nährmedium, welches für die Keimung der Turionen und das Wachstum der Fronds verwendet wird

3.5

Inokulation

Übertragen eines gekeimten Turions mit seinem kleinen Frond in alle Nöpfchen zu Beginn des Toxizitätstests

3.6

Reinwasser

deionisiertes oder destilliertes Wasser mit einer hydraulischen Leitfähigkeit von unter 10 µS/cm

3.7

Wurzel

Teil einer Pflanze, der sich unter dem Frond entwickelt

3.8

Stammkultur

Laborkultur der Wasserlinse zur Herstellung des Turions

3.9

Testverdünnungsmedium

Wachstumsmedium, welches auch als Verdünnungsmedium für den Test verwendet wird

3.10

Testgut

Anteil des gesammelten Materials oder der verdünnten Chemikalie, welcher zur Vorbereitung der Verdünnungsreihe verwendet wird

3.11

Turion

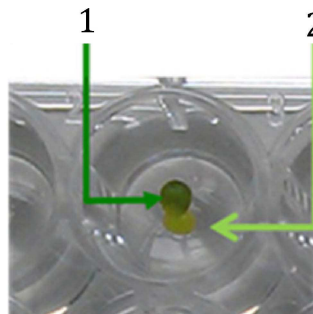
kleine vegetative Knospe, welche sich aus einer Wasserlinsenkolonie unter bestimmten Umgebungsbedingungen entwickelt.

4 Grundsatz

Turionen, die durch die Kultivierung von *Spirodela polyrhiza* hergestellt wurden oder aus den Reagenzgläsern, in welchen sie gelagert sind, entnommen wurden (siehe Anhang A), werden in eine Petrischale mit Wachstumsmedium übertragen und für 3 Tage bei 25 °C bei ständiger Beleuchtung von mindestens 6 000 lx (entspricht etwa $85 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inkubiert.

In dieser Zeit keimen die Turionen und bilden ein kleines (erstes) Frond (siehe Bild 1).

Ein gekeimtes Turion mit seinem ersten Frond wird dann aus der Petrischale entnommen und in jedes der 6×8 Nöpfchen einer Mikrotiterplatte, welche die giftigen Verdünnungen und die Negativkontrolle (wovon beide im Wachstumsmedium vorbereitet wurden) enthält, inokuliert.



Legende

- 1 Turion
- 2 erstes Frond

Bild 1 — Vergrößerung eines gekeimten Turions mit seinem ersten Frond in einem Nöpfchen der Mikrotiterplatte

Nach Beenden der Inokulationen wird mit einer digitalen Kamera ein Photo der Mikrotiterplatte aufgenommen (= nach t0h) und auf einem Computerordner gespeichert.

Die Mikrotiterplatte wird anschließend für drei Tage bei $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ bei ständiger Beleuchtung von mindestens 6 000 lx inkubiert; danach wird erneut ein Photo aufgenommen (= nach t72 h) und auf einem Computerordner gespeichert.

Die Fläche des ersten Fronds in jedem Näpfchen wird mithilfe eines Bildanalyseprogramms und den zwei Photos der Mikrotiterplatte gemessen (d. h. aufgenommen nach t0 h und nach t72 h).

Das Wachstum der ersten Fronds in den Kontrollen und in den Testkonzentrationen bzw. -verdünnungen wird berechnet aus der Differenz zwischen den t72h-Flächen und den t0h-Flächen, wonach die Wachstumshemmung und die 72 h EC50- oder ECx-Werte bestimmt werden.

5 Testorganismen

Bei der in dieser Internationalen Norm verwendeten Art handelt es sich um die Wasserlinse *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid.

Die Testorganismen werden durch Keimung aus (gelagerten) Turionen gewonnen.

Turionen können im Labor nach dem in Anhang A beschriebenen Verfahren hergestellt werden.

Sie können auch käuflich erworben werden¹⁾.

6 Wachstumsmedium

Bei dem Wachstumsmedium (3.4), welches für die Keimung der Turionen und das Wachstum der Wasserlinsen während des Toxizitätstests verwendet wird, handelt es sich um das „modifizierte STEINBERG-Medium“, welches in ISO 20079 sowie in der OECD-Richtlinie für das Testen von Chemikalien beschrieben und verwendet wird (siehe Verweisung [1]).

Dieses Medium wird auch zur Herstellung der giftigen Verdünnungen genutzt.

Das Wachstumsmedium besteht aus „Makroelementen“ und „Mikroelementen“, von denen Stammlösungen nach Tabelle 1 bzw. Tabelle 2 hergestellt werden.

6.1 Herstellung von Stammlösungen

Die 8 Stammlösungen sind durch Zugabe des vorgegebenen Gewichts der Chemikalien zu 1 l Reinwasser (3.6) herzustellen.

Tabelle 1 — Stammlösungen aus Makroelementen

Makroelemente (50-fach konzentriert)		g/l
Stammlösung 1	KNO ₃	17,50
	KH ₂ PO ₄	4,5
	K ₂ HPO ₄	0,63
Stammlösung 2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5,00
Stammlösung 3	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	14,75

¹⁾ Beispiele für geeignete handelsübliche Produkte sind Turionen, die von MicroBioTests Inc, Mariakerke-Gent, Belgien, bezogen werden können. Diese Angabe dient nur zur Unterrichtung der Anwender dieses Dokuments und bedeutet keine Anerkennung dieses genannten Produktes durch ISO.

Tabelle 2 — Stammlösungen aus Mikroelementen

Mikroelemente (1 000-fach konzentriert)		mg/l
Stammlösung 4	H_3BO_3	120,00
Stammlösung 5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	180,00
Stammlösung 6	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44,0
Stammlösung 7	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	180,00
Stammlösung 8	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	760,00
	EDTA-Dinatrium-Dihydrat	1 500,00

Stammlösungen 2 und 3 und 4 bis 7 dürfen vereinigt werden (unter Berücksichtigung der benötigten Konzentrationen).

6.2 Herstellung der finalen Konzentration des modifizierten STEINBERG-Mediums

Jeweils 20 ml der Stammlösungen 1, 2 und 3 ist in etwa 900 ml Reinwasser (3.6) in einem Messkolben mit einem Fassungsvermögen von 1 l zu geben.

Danach ist jeweils 1,0 ml der Stammlösungen 4, 5, 6, 7 und 8 hinzuzugeben.

Der Messkolben ist auf 1 000 ml mit Reinwasser aufzufüllen.

Der pH des Wachstumsmediums sollte bei $5,5 \pm 0,2$ liegen und kann mit HCl oder NaOH angepasst werden.

Nach der Herstellung verfügt das Wachstumsmedium über eine relativ kurze Lagerfähigkeit und sollte innerhalb von zwei Wochen nach der Herstellung verwendet werden.

7 Geräte

Übliche Laborgeräte und zusätzlich:

7.1 Temperierbarer Schrank oder Raum oder Inkubator, mit gleichmäßiger, weißer Beleuchtung von mindestens 6 000 lx auf der Oberfläche der Turion-Keimungs-Petrischale und der Mikrotiterplatte.

7.2 Beleuchtungsmessgerät, zur Messung der Lichtintensität auf der Oberfläche der Turion-Keimungs-Petrischale und der Mikrotiterplatte.

7.3 pH-Messgerät, zur Überprüfung und/oder Anpassung des pH-Wertes des Wachstumsmediums.

7.4 Laborglasgefäße, zur Herstellung der Testkonzentrationen (Messkolben, Messzylinder, Pipetten, Reagenzgläser).

7.5 Petrischalen, mit einem Durchmesser von 9 cm und Deckel zur Keimung der Turionen.

7.6 Mikrosieb, mit einer Maschenweite von 100 µm zum Abspülen der gelagerten Turionen.

7.7 Mikrotiterplatten, mit 6 × 8 Näpfchen als Testplatten.

7.8 Kunststoffspatel, zum Übertragen der gekeimten Turionen in die Näpfchen der Mikrotiterplatten.

7.9 Digitalkamera, zur Aufnahme eines Photos von der Mikrotiterplatte mit den wachsenden Wasserlinsen.

7.10 Bildanalyzesystem, zur Messung der Fläche der ersten Fronds.

8 Referenzchemikalien

8.1 3,5-Dichlorophenol, analysenrein mit > 99 % Reinheit.

8.2 Kaliumchlorid, KCl, analysenrein mit > 99 % Reinheit.

9 Verfahrensweise

9.1 Keimung der *Spirodela polyrhiza*-Turionen

Bei Verwendung von Turionen einer Kultur von *Spirodela polyrhiza* sind die Turionen in eine Petrischale (7.5) zu platzieren und 30 ml Wachstumsmedium sind einzufüllen (3.4).

Bei Beginn mit gelagerten Turionen ist ein Reagenzglas mit gelagerten Turionen leicht zu schütteln, um die Turionen zu lösen.

Der Inhalt des Reagenzglases ist in ein Mikrosieb (7.6) zu gießen und mit Reinwasser (3.6) abzuspülen, um das gelagerte Medium zu entfernen.

10 ml Wachstumsmedium (3.4) sind in eine Petrischale zu geben (7.5).

Das Mikrosieb ist umzudrehen und alle Turionen durch Gießen von 10 ml Wachstumsmedium über die Oberfläche des Mikrosiebs herauszuspülen.

Der Petrischale sind nochmals 10 ml Wachstumsmedium hinzuzufügen.

Die Petrischale ist mit dem durchsichtigen Deckel zu schließen und in den Inkubator oder in den temperierbaren Raum zu legen (7.1).

Die Petrischale ist drei Tage ($72 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$) bei $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ bei gleichmäßiger Beleuchtung (von mindestens 6 000 lx an der Oberfläche der Petrischale) zu inkubieren.

ANMERKUNG Sowohl die Keimung der Turionen als auch das Wachstum der ersten Fronds ist „sehr stark“ abhängig von der Temperatur und den Lichtbedingungen. Es ist daher wichtig, dass die beschriebenen Werte für Temperatur und Beleuchtung so genau wie möglich eingehalten werden.

9.2 Abwassertests

9.2.1 Zugabe von konzentriertem Wachstumsmedium zur Abwasserprobe

80 ml Abwasser sind in einen kalibrierten Messkolben mit einem Fassungsvermögen von 100 ml zu geben.

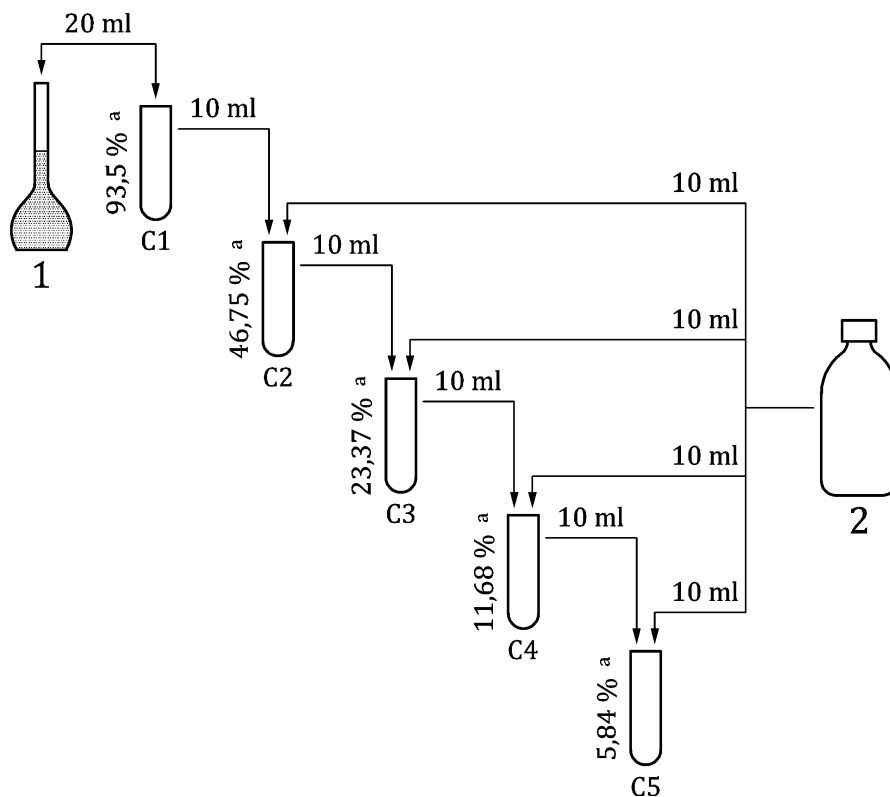
Jeweils 2 ml der Stammlösungen 1, 2 und 3 sowie jeweils 100 µl der Stammlösungen 4, 5, 6, 7 und 8 sind dem kalibrierten Messkolben hinzuzugeben.

Der Messkolben ist bis auf die 100 ml-Markierung aufzufüllen, zu verschließen und gründlich zu schütteln bis der Inhalt homogen ist.

ANMERKUNG Die Zugabe von 6,5 ml Wachstumsmedium (3.4) zu 93,5 ml Abwasser verdünnt die Abwasserprobe um etwa 6 %. Das bedeutet, dass die höchste Abwasserkonzentration, die getestet wird, bei etwa 94 % der originalen Abwasserprobe liegt.

9.2.2 Herstellung der Abwasserverdünnungen

Eine 1:1-Verdünnungsreihe wird aus dem 94-prozentigen Abwasser hergestellt (siehe Bild 2).



Legende

- 1 Abwasser mit Wachstumsmedium
- 2 Wachstumsmedium
- 3 Abwasser

Bild 2 — Herstellung der 1:1-Abwasserverdünnungsreihe

9.2.3 Verfahrensweise

Fünf Reagenzgläser mit einem Inhalt von jeweils 20 ml sind mit C1, C2, C3, C4 und C5 zu beschriften.

20 ml Abwasser sind hinzuzufügen und das Reagenzglas ist zu schütteln.

Den Reagenzgläsern C2, C3, C4 und C5 sind 10 ml Wachstumsmedium (als Verdünnungsmedium) hinzuzufügen.

10 ml Abwasser von Reagenzglas C1 sind in Reagenzglas C2 zu geben und das Reagenzglas ist zu verschließen und zu schütteln.

10 ml Testverdünnung von Reagenzglas C2 sind in Reagenzglas C3 zu geben und das Reagenzglas ist zu verschließen und zu schütteln.

Dieses Verfahren ist für die nächsten Verdünnungen zu wiederholen.

Die Konzentrationen des zu testenden Abwassers sind in Tabelle 3 angegeben.

Tabelle 3 — Verdünnungsreihe des Abwassers

Reagenzglas	Abwasserkonzentration(in %)
C1	93,50
C2	46,75
C3	23,37
C4	11,68
C5	5,84

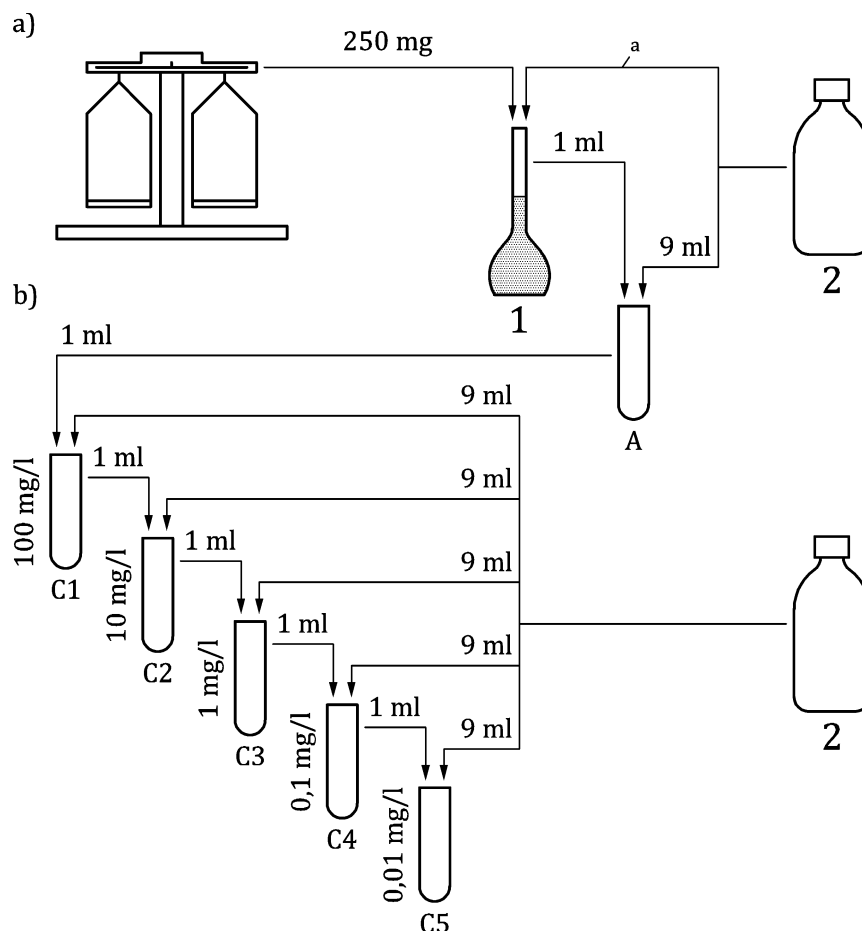
9.3 Tests der chemischen Verbindungen

Falls die „ungefähre Toxizität“ (= Größenordnung) der zu testenden chemischen Verbindung nicht bekannt ist, muss zuerst ein „Bereichsfeststellungstest“ durchgeführt werden, um den Toleranzbereich der Wasserlinsen von 0 % bis 100 % gegenüber des Giftstoffes zu bestimmen.

9.3.1 Bereichsfeststellungstest

Eine 1:10-Verdünnungsreihe wird in Reagenzgläsern von 10 ml in Wachstumsmedium (als Verdünnungsmedium) hergestellt.

Bild 3 zeigt ein Beispiel der Herstellung eines Konzentrationsbereichs einer Chemikalie von 100 mg/l bis 0,01 mg/l.



Legende

- 1 Messkolben mit einem Fassungsvermögen von 25 ml
- 2 Wachstumsmedium
- a) Stammlösung
- b) Testkonzentrationen
- a bis zur Markierung füllen

Bild 3 — Herstellung einer Verdünnungsreihe von 100 mg/l bis 0,01 mg/l für einen Bereichsfeststellungstest an einer Reinchemikalie

9.3.2 Definitiver Test

Die herzustellende Verdünnungsreihe umfasst den Bereich von der niedrigsten Konzentration mit einer Wirkung von 100 % bis zur höchsten Konzentration mit einer Wirkung von weniger als 10 % im Bereichsfeststellungstest.

Eine Verdünnungsreihe wird hergestellt, wobei mit einer Testkonzentration des Giftstoffes begonnen wird, die die niedrigste mit einer Wirkung von 100 % Wachstumshemmung im Bereichsfeststellungstest darstellte.

Anschließend erfolgt die Herstellung einer logarithmischen Verdünnungsreihe (10 - 5,6 - 3,2 - 1,8 - 1 + Negativkontrolle) in 10-ml-Reagenzgläsern mit den in Bild 4 angegebenen Mengen von Wachstumsmedium und Giftstoff.